

Aus der II.Inneren Abteilung des Städt.Krankenhauses

Berlin - Neukölln

(Chefärztin: Prof.Dr.I.Boll)

Über den Einfluß von Dehydroepiandrosteron auf die
Kinetik menschlichen Knochenmarks in vitro

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Heinz Lange

aus Neumünster

1976

Aus der II.Inneren Abteilung des Städt.Krankenhauses

Berlin - Neukölln

(Chefärztin: Prof.Dr.I.Boll)

Über den Einfluß von Dehydroepiandrosteron auf die
Kinetik menschlichen Knochenmarks in vitro

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Zahnarzt Heinz Lange

aus Neumünster

Referent: Prof.Dr.I.Boll

Korreferent: Prof.Dr.H.Michel

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-,Mund-
und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 25.10.1976

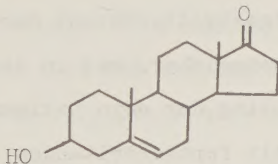
Seite	1 - 4	:	Einleitung
Seite	5 - 11	:	Material und Methode
Seite	12 - 30	:	Ergebnisse
Seite	31	:	Zusammenfassung der Ergebnisse
Seite	32 - 33	:	Diskussion
Seite	34	:	Zusammenfassung
Seite	35 - 37	:	Literaturverzeichnis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Literaturübersicht

1934 konnte A.BUTENANDT aus menschlichem Harn eine Substanz isolieren, deren physiologische Bedeutung unbekannt war und deren adrenale Herkunft lange nur vermutet werden konnte - Dehydroepiandrosteron(DHEA).



Zwanzig Jahre später wurde auch im peripheren Blut ein sehr hoher Gehalt an DHEA gefunden, der annehmen ließ, daß es eine der Hauptkomponenten der Gesamt-17-Keto-Steroide im Plasma darstellt.⁽¹⁸⁾

Auf Grund struktureller Ähnlichkeit mit den Androgenen charakterisierte BEAULIEU⁽¹⁾ dieses C₁₉-Steroid als "NNR-Androgen", obwohl seine spezifisch androgene Wirkung bedeutend schwächer ist als etwa die der Androgene des Hodens. Im menschlichen Organismus liegt DHEA fast ausschließlich als Sulfokongugat vor⁽⁸⁾. Es kann von der NNR als Sulfat sezerniert oder in der Leber aus freiem DHEA gebildet werden⁽¹⁾.

In neueren Untersuchungen konnte G.W.OERTEL nachweisen, daß die endogene Form des DHEA im Wesentlichen nicht das Sulfat ist, sondern das Sulfatid, ein Ester der Sulfatidsäure, der infolge seiner lipophilen Eigenschaften lipidhaltige Zellmembranen zu durchdringen vermag. Seine Konzentration im Plasma soll mehr als 200 µg/ 100 ml erreichen können, während der Anteil des freien Steroids und des DHEA-Glu -

curonisids nur bei 1,0 % bzw. 0,5 % des Gesamt-Plasma -
Spiegels liegen soll⁽¹⁴⁾.

Nun ist bekannt, daß der DHEA-Gehalt im Blut sehr unter -
schiedlich sein kann. Bei Männern ist er normalerweise um
45 % signifikant höher als bei Frauen⁽¹³⁾. Auch in Perioden
geschlechtshormoneller Umstellungen wurden erhebliche
Schwankungen festgestellt. Während der präpubertären Phase
ist DHEA nicht nachweisbar. Erst in der Pubertät erfolgt ein
Konzentrationsanstieg, der sein Maximum im Alter von 20-29
Jahren erreicht. Mit fortschreitendem Alter nimmt der Gehalt
ständig ab⁽¹⁸⁾.

SCHINDLER gibt an, daß DHEA-Sulfat als wichtige Vorstufe für
die plazentare Östradiolbiosynthese aufgefaßt werden muß.
Demzufolge kommt es im Verlaufe einer Schwangerschaft zu
einem kontinuierlichen Abfall von DHEA-Sulfat, da es durch
die Plazenta in zunehmendem Maße in Östron und Östradiol
und -nach vorangehender 16-Hydroxylierung in der mütter -
lichen Leber- in Östriol umgewandelt wird⁽¹⁶⁾.

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, auf welchem
Wege DHEA in die Stoffwechselvorgänge eingreift.

Da es die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase(G-6-PDH) spezi-
fisch und nichtkompetitiv hemmt, besitzt es eine wichtige
Regulierungsfunktion im Pentose-Phosphat-Cyclus(PPC), einem
Stoffwechselweg, der eine wesentliche Rolle bei der Nuklein-
säuresynthese spielt. Hier können die dafür notwendigen Pen-
tosen bereitgestellt werden, ferner wird Tetrahydrofolsäure
gebildet, die als Coenzym am Einbau der Kohlenstoffatome C₂
und C₈ in die Purinkörper mitwirkt und an der Methylierung
von Desoxyuridinmonophosphat zu Thymidinmonophosphat betei-

ligt ist⁽⁸⁾.

OERTEL et al. konnten durch Messung der Enzymaktivität nachweisen, daß nur DHEA-Sulfatid und freies DHEA die G-6-PDH wirksam zu hemmen vermögen. Dabei soll die Aktivität des Sulfatids die des freien Steroids bei weitem übertreffen⁽¹⁵⁾.

BENES und OERTEL geben für die Abnahme der Hemmwirkung auf die G-6-PDH von Sulfatid:freies DHEA:Sulfat ein Verhältnis von 40:20:1 an⁽³⁾, während sich die Penetrationsrate durch die Erythrocytenmembran im Verhältnis 10:5:1 verringern soll⁽⁸⁾.

HILGERTOVA et al. diskutierten eine Korrelation zwischen G-6-PDH, Außentemperatur und DHEA-Ausscheidung im Urin. Ob - schon im Winter eine hohe G-6-PDH-Aktivität einer niedrigen DHEA-Ausscheidung entsprach, konnte für das ganze Jahr keine statistisch signifikante Abhängigkeit nachgewiesen werden⁽⁷⁾.

Ein aus dem gestörten Gleichgewicht 17-Keto-Steroide/17 β -Hydroxy-Steroide resultierender extra- und intrazellulärer Mangel an DHEA scheint für das Auftreten der Psoriasis pathogenetisch zu sein. Nachdem SONKA et al. schon 1965 die Existenz eines DHEA-Mangelsyndroms postuliert hatten, das sich in verschiedenen Stoffwechselerkrankungen wie Gicht, Fettleber, Diabetes, vorzeitiger Arteriosklerose, Thromboseneigung sowie verschiedenen Hypertonieformen manifestieren sollte, konnte HOLZMANN auch die Psoriasis hier einordnen⁽⁸⁾⁽¹²⁾.

Es lag nun nahe, diese Substanz auch klinisch anzuwenden und einen verminderten DHEA-Gehalt zu substituieren.

Durch die perorale Gabe von 200 mg DHEA-Sulfat/ die konnte HOLZMANN die Psoriasis-symptome beeinflussen. Gleichwohl ließ sich infolge des gestörten DHEA-Metabolismus kein ge-

nügend hoher Sulfatidspiegel aufbauen, als daß der PPC auf diesem Wege hinreichend gebremst werden könnte⁽⁹⁾. Bessere Ergebnisse erzielte er durch die intramuskuläre Verabreichung von 200 mg DHEA-Oenanthat/ Woche, die zu einer Reduktion der überstürzt ablaufenden Teilungsvorgänge in der Epidermis führten⁽¹⁰⁾.

Der Einfluß von DHEA auf den Mitosecyclus wurde von HOLZMANN et al. in vitro an stimulierten Lymphozytenkulturen untersucht. Es zeigte sich, daß freies DHEA bis zu einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-4}$ M/l eine Abnahme der Mitoserate bewirkt. Da durch Erhöhung der Konzentration keine weitere Reduzierung der Mitoseaktivität erreicht wurde, nahm er eine mitoseregulierende Funktion des Hormons an⁽¹¹⁾.

TAKAKU berichtet von einer leichten Stimulierung der Erythropoese durch DHEA, gemessen an der radioaktiv bestimmten Hämsynthese an menschlichem Knochenmark in vitro und an der polycythämischen Maus⁽¹⁷⁾.

Die vorliegende Arbeit will mit dem Mittel der Differential- und Mitosezählung prüfen, ob die Kinetik von menschlichen Knochenmarkzellen in vitro durch Zusatz von $1,5 \cdot 10^{-5}$ M/l DHEA zu unseren Knochenmarkkulturen beeinflußt werden kann.

Material und Methode

Für unsere Versuche wurde bei 5 Patienten durch Sternal -
punktion Knochenmark entnommen und mit der von BOLL⁽⁴⁾ mo-
difizierten CARRELLschen Koagulumkulturtechnik aufbereitet.
Folgende Medien wurden zur Koagulation gebracht:

A. Kontrollkulturen der Versuche II+V

- 50% Eigenplasma des Patienten
- 40% Eigenserum des Patienten
- 10% Corhormon^R dreifach verstärkt^x

B. Kontrollkulturen der Versuche I, III, IV

- 50% Eigenplasma des Patienten
- 30% Eigenserum des Patienten
- 10% Glukose 200 mg%
- 10% Corhormon^R dreifach verstärkt^x

C. Zusatzkulturen der Versuche II+V

- 50% Eigenplasma des Patienten
- 30% Eigenserum des Patienten
- 10% Corhormon^R dreifach verstärkt^x
- 10% DHEA 40 µg/ml

D. Zusatzkulturen der Versuche I, III, IV

- 50% Eigenplasma des Patienten
- 20% Eigenserum des Patienten
- 10% Glukose 200 mg%
- 10% Corhormon^R dreifach verstärkt^x
- 10% DHEA 40 µg/ml, sodaß eine Endkonzentration von 4 µg/ml
entsteht.

^x Fa Homburg AG sei für die Herstellung gedankt

- -

Auf diese Koagula wurde jeweils ein Knochenmarkbröckchen gesetzt und mit einem Tröpfchen Serum bedeckt, das wiederum MLLA in der angegebenen Endkonzentration enthielt. Nachdem das Material mit einem Hohlschliffobjektträger luftdicht verschlossen war, wurde diese Deckglaskultur im hängenden Tropfen bei 37°C bebrütet.

Auf diesem Wege ist es möglich, die Kulturen über 3 Tage am Leben zu erhalten.

Alle 24 Stunden wurden von den Kulturen Ausstrichpräparate angefertigt und nach PAPENHEIM gefärbt. Wir erhielten so von jedem Patienten neben dem Sofortausstrich des Knochenmarks eine Reihe von Präparaten, die den gesamten dreitägigen Kultivierungszeitraum umfaßten und aus denen je Präparat 2000 Knochenmarkzellen samt der auf sie entfallenden Mitosen differenziert wurden.

Es wurden nach den von BOLL^(4,5) angegebenen Kriterien folgende Zelltypen berücksichtigt:

In der Erythropoese

proerythroblasten (p),
basophile Erythroblasten (bL),
polychromatische Erythroblasten (pL),
orthochromatische Erythroblasten (oE)
und reife Erythroblasten (rE).

In der Granulopoese

Myeloblasten (Mb),
Promyelozyten (Pm),
neutrophile Myelozyten (My),
eosinophile Myelozyten (eo.y),
basophile Myelozyten (bk.y),

Promonozyten (PMo),
Metamyelozyten (Mk),
neutrophile stabkernige Granulozyten (St),
neutrophile segmentkernige Granulozyten (Seg),
eosinophile segmentkernige Granulozyten (eoS),
basophile segmentkernige Granulozyten (bS)
und Monozyten (Mo).

Die Zellen wurden in der Erythropoese bis zu den orthochromatischen Erythroblasten, in der Granulopoese bis zu den Metamyelozyten als teilungsfähig angesehen.

Die Mitosephasen wurden nach BOLL⁽⁴⁾ wie folgt gegeneinander abgegrenzt:

<u>Prophase:</u>	Auflösung der Kernmembran, keine Nucleoli, festes Spirem.
<u>Frühe Metaphase:</u>	Verteilung der Chromosomen über die ganze Zelle, lockeres Spirem.
<u>Späte Metaphase:</u>	Anordnung der Chromosomen zur Äquatorialplatte bzw. zum Monaster.
<u>Anaphase:</u>	Anordnung der Chromosomen zum Diaster.
<u>Telophase:</u>	Cytoplasmaeinschnürung, Bildung eines lockeren Dispirems.
<u>Rekonstruktionsphase:</u>	Zwei durch Cytoplasmateilung entstandene Zellen mit festem Dispirem.

Um Aussagen über das Reifungs- und Regenerationsverhalten der Knochenmarkszellen in den Kulturen machen zu können, wurden diese Parameter erstellt:

- Reifungskurven = Prozentuale Verteilung der Erythro-
bzw. der Granulopoese zu den ver-
schiedenen Zeitpunkten der Kultur
- Mitoseindices = Anzahl der Mitosen/Anzahl der teil-
lungsfähigen Zellen in Promille
- Caryologische Kurven = Prozentuale Verteilung der Mitose-
stadien
- G/E - Indices = Das Verhältnis der gesamten Granulo-
poese zur gesamten Erythropoese

Für die Versuche stand uns das Sternalmark folgender Patienten zur Verfügung:

Versuch I

Patient Fo, F. (69 J.)

Diagnose: Schwere Leberparenchymschädigung bei dringendem Verdacht auf Lebercirrhose

Therapie bis zum Sternalpunktat: Konakion^R, Kalium jodatum, Novodigal^R, Aldaktone^R, Bactrim^R, Primobolan Dep.^R

Blutbild: Hb 11,8 g%
Ery 3,36 Mio/ μ l
Hb_E 35,0 pg
Leucoc. 4700/ μ l
Stabk. 4 %
Segmentk. 80 %
Lymphoc. 10 %
Monoc. 6 %
Thromboc. 110000/ μ l

Versuch II

Patientin Ha, M. (73 J.)

Diagnose: Dekompensierte perniziöse Anämie zur Zeit des Sternalpunktats

Therapie bis zum Sternalpunktat:

Kaliner^R, Lanicor^R, Pepsalettsaft^R

Blutbild: Hämatokrit 24 %
Hb 8,5 g%
Ery 2,18 Mio/ μ l
Hb_E 39,0 pg

Leucoc.	7000/ μ l
Stabk.	1 %
Segmentk.	55 %
Lymphoc.	36 %
Monoc.	8 %
Thromboc.	150000/ μ l

Versuch III

Patientin Fu, B. (30 J.)

Diagnose: Rezidivierende Maculablutungen bds., latenter Diabetes mell., Zustand nach Milzextirpation wegen Thrombocytopenie infolge splenogener Markhemmung und Lungenembolie

Therapie bis zum Sternalpunktat:

Adrenoxyl^R, Bactrim^R, Colfarit^R, Dexium^R, Rutiscalzon^R

Blutbild:	Hb	12,8 g%
	Ery	4,13 Mio/ μ l
	Hb _E	31,0 pg
	Leucoc.	3800/ μ l
	bas Seg	3 %
	eos Seg	7 %
	Stabk.	4 %
	Segmentk.	40 %
	Lymphoc.	34 %
	Monoc.	12 %
	Thromboc.	410000/ μ l

Versuch IV

Patient Wei, J. (37 J.)

Diagnose: Morbus Hodgkin seit 1 Jahr

Therapie bis zum Sternalpunktat:

Triphosphamid^R

Blutbild:	Hb	12,2 g%
	Ery	4,27 Mio/ μ l
	Leucoc.	13000/ μ l
	eos Seg	3 %
	Stabk.	8 %
	Segmentk.	80 %
	Lymphoc.	7 %
	Monoc.	2 %
	Thromboc.	330000/ μ l

Versuch V

Patientin Vö, E. (68 J.)

Diagnose: Plasmocytom zur Zeit des Sternalpunktats

Therapie bis zum Sternalpunktat:

Euglucon^R, Hydergin^R, Novalgin^R, Fortral^R

Blutbild:	Hämatokrit	17 %	
	Hb	5 g%	
	Ery	1,82 Mio/ μ l	
	Hb _E	27,4 pg	
	Leucoc.	12000/ μ l	
	eos Seg	2 %	
	Metamyeloc.	2 %	
	Stabk.	6 %	Segmentk. 52 %
	Lymphoc.	35 %	Monoc. 3 %
	Thromboc.	240000/ μ l	

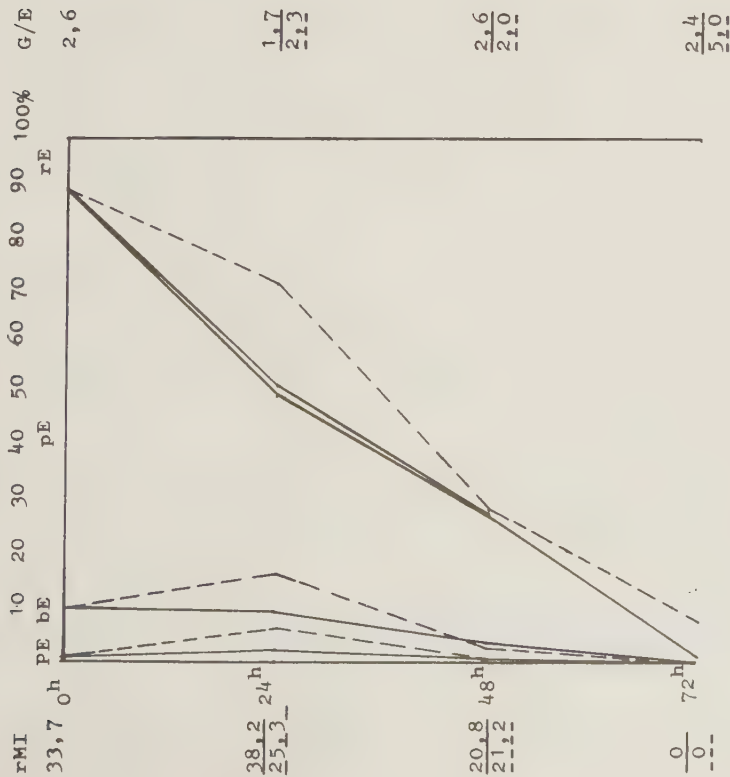
Ergebnisse

Unseren Ergebnissen liegt die Differenzierung von 70000 Knochenmarkzellen einschließlich der darauf entfallenden Mitosen zugrunde. Es wurde in 5 Versuchen jeweils das Reifungsverhalten von Zellen der Erythro- und Granulopoese in Kontrollkulturen und in Kulturen, in denen freies DHEA in einer Endkonzentration von $1,5 \cdot 10^{-5}$ M/l enthalten war, untersucht und in Form von Reifungskurven, in denen die prozentuale Verteilung der Reifungsstufen während der ersten drei Kulturtage additiv aufgetragen wurde, graphisch dargestellt.

Versuch I (Abb. 1)

Anhand der Reifungskurven ist in der Erythropoese zu allen Beobachtungszeiten eine kontinuierliche Zunahme der reifen Erythroblasten zu ersehen. In den Kontrollkulturen ist schon nach 24 Std. ein Absinken des polychromatischen Erythroblastenanteils auf die Hälfte erkennbar - eine Tendenz, die sich fortsetzt, bis nach 72 Std. nur noch reife Erythroblasten prozentual erfaßbar sind. In den Zusatzkulturen zeigt sich ein deutlich verzögertes Reifungsverhalten aller unreifen Zellformen nach 24 Std. Später gleichen sich die Werte denen der Kontrolle an; es verbleibt jedoch am Ende der 3-Tage-Kultur noch ein Anteil an polychromatischen Erythroblasten. In der Granulopoese findet sich eine unter dem Zusatz beschleunigte Ausreifung während der ersten zwei Kulturtage, wobei besonders der Anteil der segmentkernigen Granulozyten gegenüber den Kontrollen zunimmt. Der G/E-Index sinkt in den Kontrollkulturen am ersten Tag etwas ab, erreicht dann aber wieder den Ausgangswert, während

Erythropoese



Granulopoese

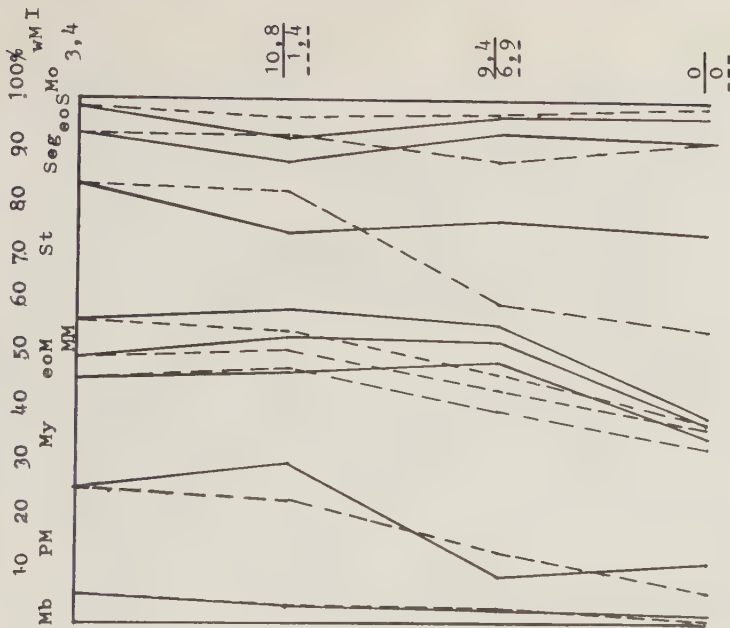


Abb.1 Reifungskurven der Erythropoese und Granulopoese

— Kontrolle
 ---- Zusatz

er in den Zusatzkulturen relativ konstant bleibt und nach 72 Std. auf das Doppelte ansteigt.

Der rote Mitoseindex zeigt sich im Wesentlichen unverändert, während sich in der Granulopoese die Mitoseindices nach 24 Std. und nach 48 Std. erniedrigen.

Versuch II (Abb.2)

In diesem Versuch nimmt der am Kulturbeginn recht hohe Anteil an Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten schon nach 24 Std. rapide ab, während die polychromatischen Erythroblasten nach anfänglich schneller Ausreifung zum Kulturende hin langsamer ausreifen. Auffällig ist auch, daß sich der Anteil der orthochromatischen Erythroblasten bei fortschreitender Kulturdauer ständig vergrößert. Demgegenüber erscheint die Ausreifung aller teilungsfähigen roten Zellen unter dem DHEA-Zusatz bis 48 Std. beträchtlich verzögert. Aus den Reifungskurven der Granulopoese läßt sich nach 24 Std. sowohl für die Kontroll- als auch für die Zusatzkulturen eine prozentuale Zunahme der Promyelozyten und der Myelozyten ablesen, während die reifen Zellformen anteilmäßig zurückgehen. Die 48-Std.- und die 72-Std.-Kultur zeigen eine Abnahme der Promyelozyten und die beschleunigte Ausreifung zu neutrophilen segmentkernigen Granulozyten in den DHEA-Kulturen.

Der G/E-Index weist im Ausgangspräparat mit 1,6 den typischen Wert für eine Anämie auf. Nach zweitägiger Kulturdauer steigt er in Übereinstimmung mit den Normwerten von BOLL (5) an, wobei er unter dem DHEA-Zusatz doppelt so hohe Werte erreicht wie in den Kontrollen.

Die Mitoseindices der roten und der weißen Reihe zeigen im

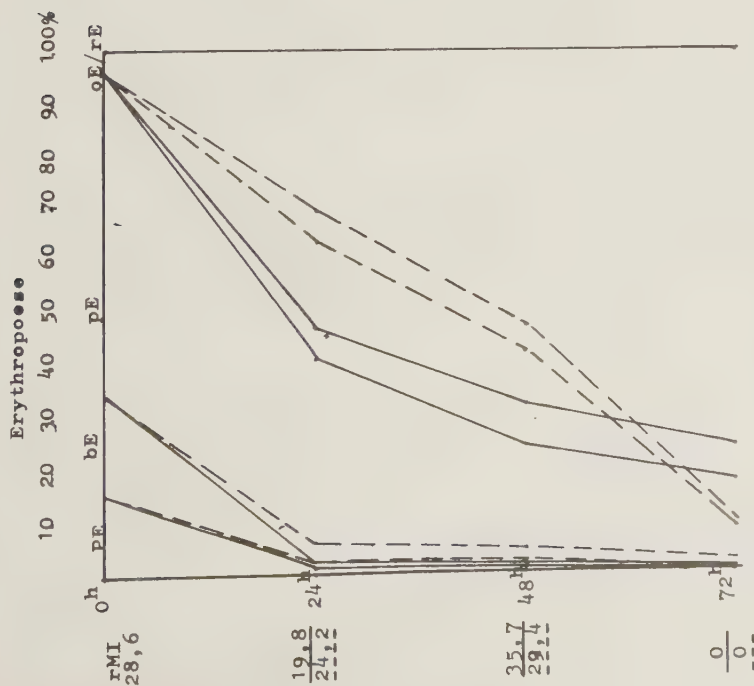
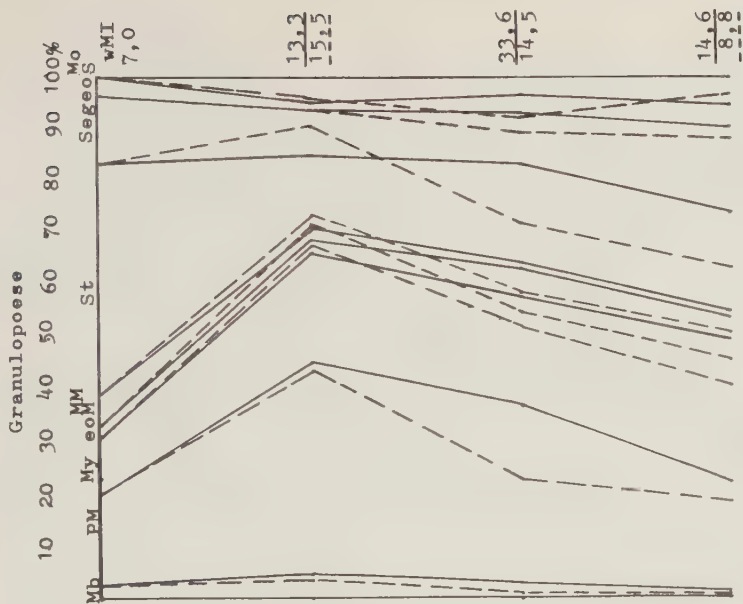


Abb.2 Reifungskurven der Erythropoese und Granulopoese



— Kontrolle
--- Zusatz

Wesentlichen keine Abweichungen.

Versuch III (Abb.3)

Die Reifungskurven der Erythropoese ergeben, daß unter dem Zusatz die Ausreifung der polychromatischen Erythroblasten am ersten Kulturtag gehemmt ist. Danach entspricht die Reifung wieder der in den Kontrollen.

Die Auswertung der weißen Reihe ergibt nach 24 Std. eine - verglichen mit den Kontrollen- verstärkte Zunahme der Promyelozyten und der Monozyten und eine Abnahme der stabkernigen und der segmentkernigen Granulozyten. Am zweiten Tag gleichen sich die Kurven einander an, während am dritten Tag die Entwicklung in eine leichte Reifungsbeschleunigung übergeht. Auffällig ist die unter dem Zusatz erfolgte starke Abnahme der Monozyten.

Der G/E-Index sinkt von dem normgerechten Wert für gesundes Knochenmark im Laufe der Kultur ab und steigt erst am Ende der Kultur wieder an. Er liegt unter DHEA-Zusatz deutlich unter den Kontrollwerten in den ersten zwei Tagen, dann aber wieder darüber.

Die Mitoseindizes beider hämatopoetischen Reihen zeigen keine eindeutige Tendenz, lediglich in der Granulopoese wurde in der Versuchskultur nach 72 Std. der ungewöhnlich hohe Wert von 46,9 % gefunden.

Versuch IV (Abb. IV)

Die Reifungskurven veranschaulichen auch in diesem Versuch einen stark verzögerten Reifungsverlauf der Erythropoese nach 24-stündiger Bebrütung in den Zusatzkulturen. Später sind keine Abweichungen mehr festzustellen.

In der Granulopoese wird durch den Zusatz eine prozentuale

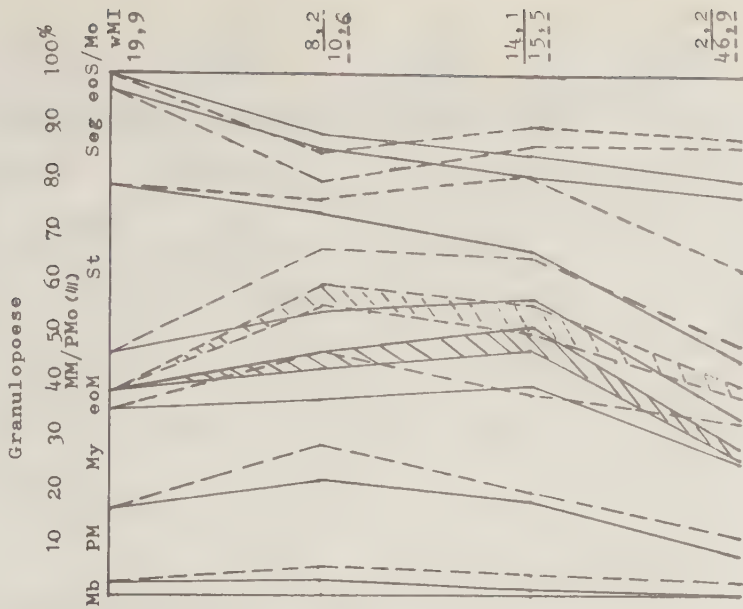
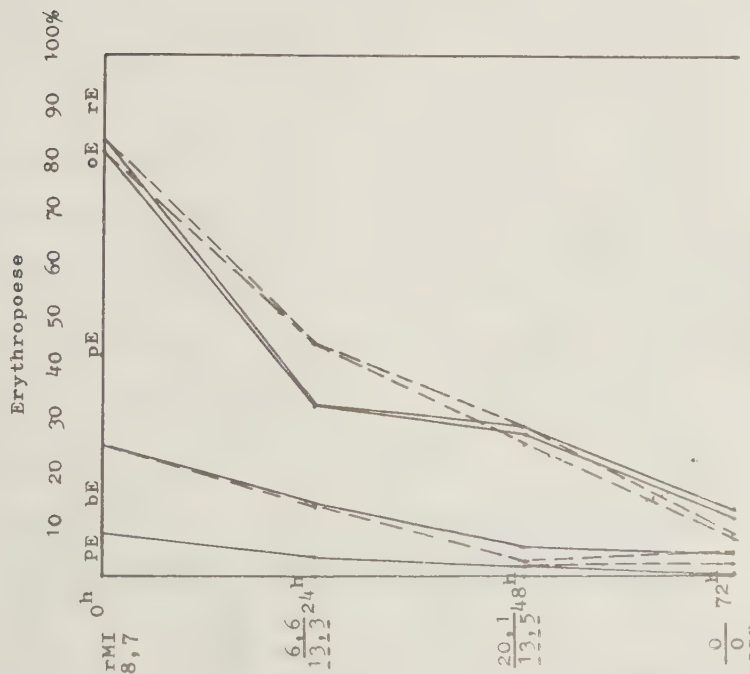


Abb. 3 Reifungskurven der Erythropoese und Granulopoese

— Kontrolle
--- Zusatz

Versuch IV: Wei,

Diagn. M.Hedgkin

Erythropoese

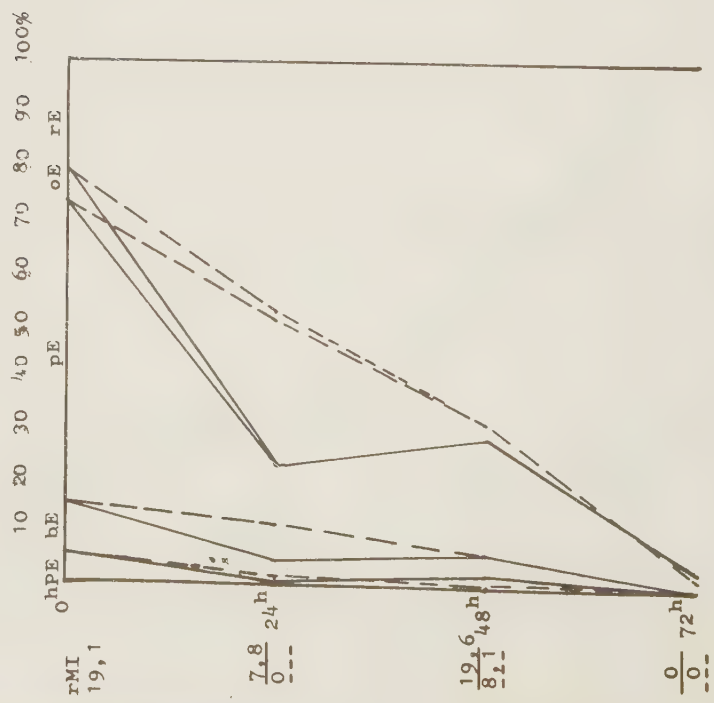
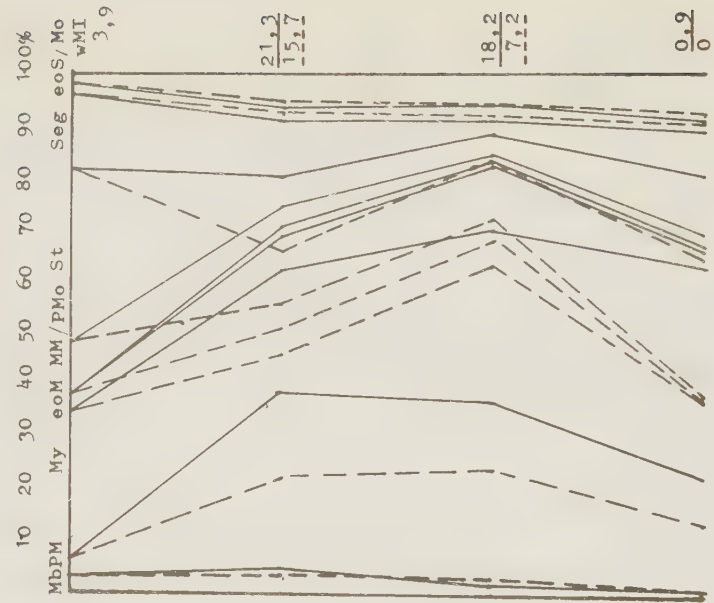


Abb. IV Reifungskurven der Erythropoese und Granulopoese

Granulopoese



Kontrolle
Zusatz

Abnahme der Promyelozyten während des gesamten Kulturzeitraumes bewirkt, während sich der Anteil der segmentkernigen Neutrophilen am 1. Kulturtag deutlich erhöht. Am 3. Kulturtag ist auch der Anteil der stabkernigen Granulozyten erhöht, sodaß sich eine Vermehrung der Reifung ergibt.

Die G/E-Indices sind in den Versuchskulturen während der ersten zwei Tage merklich erhöht und nur am Ende der Kultivierungszeit liegt der Index jedoch diesmal unter dem der Kontrollen.

In beiden hämatopoetischen Reihen zeigt sich in diesem Fall in allen Kultivierungsstufen eine Abnahme der Mitoseaktivität. Sie ist herabgesetzt nach dem Mitoseindex.

Versuch V (Abb. 5)

Auch dieser Versuch zeigt schon nach 24 Std. die bekannte starke Zunahme der reifen Erythroblasten, die durch den DHEA-Zusatz etwas vermindert wird. An den restlichen zwei Kulturtagen treten in den Versuchen nur noch polychromatische und reife Erythroblasten auf, während in den Kontrollkulturen alle Reifungsstufen prozentual vertreten sind.

Die Deutung der granulopoetischen Reifungskurve weist auf einige Unterschiede zu den vorhergehenden Versuchen hin. So ergibt sich das Bild einer im Laufe der Kultur stärker werdenden Linksverschiebung unter dem Zusatz, bis am 3. Tag fast keine segmentkernige Neutrophile mehr auftreten.

Die G/E-Indices von Kontrolle und Versuch unterscheiden sich in diesem Fall kaum voneinander. Nur in der 48-Std.-Kultur steigt der Index der Kontrolle etwas an, während er sich in der Versuchskultur nicht verändert.

Der rote Mitoseindex wird nach 24 Std. durch den DHEA-Zu -

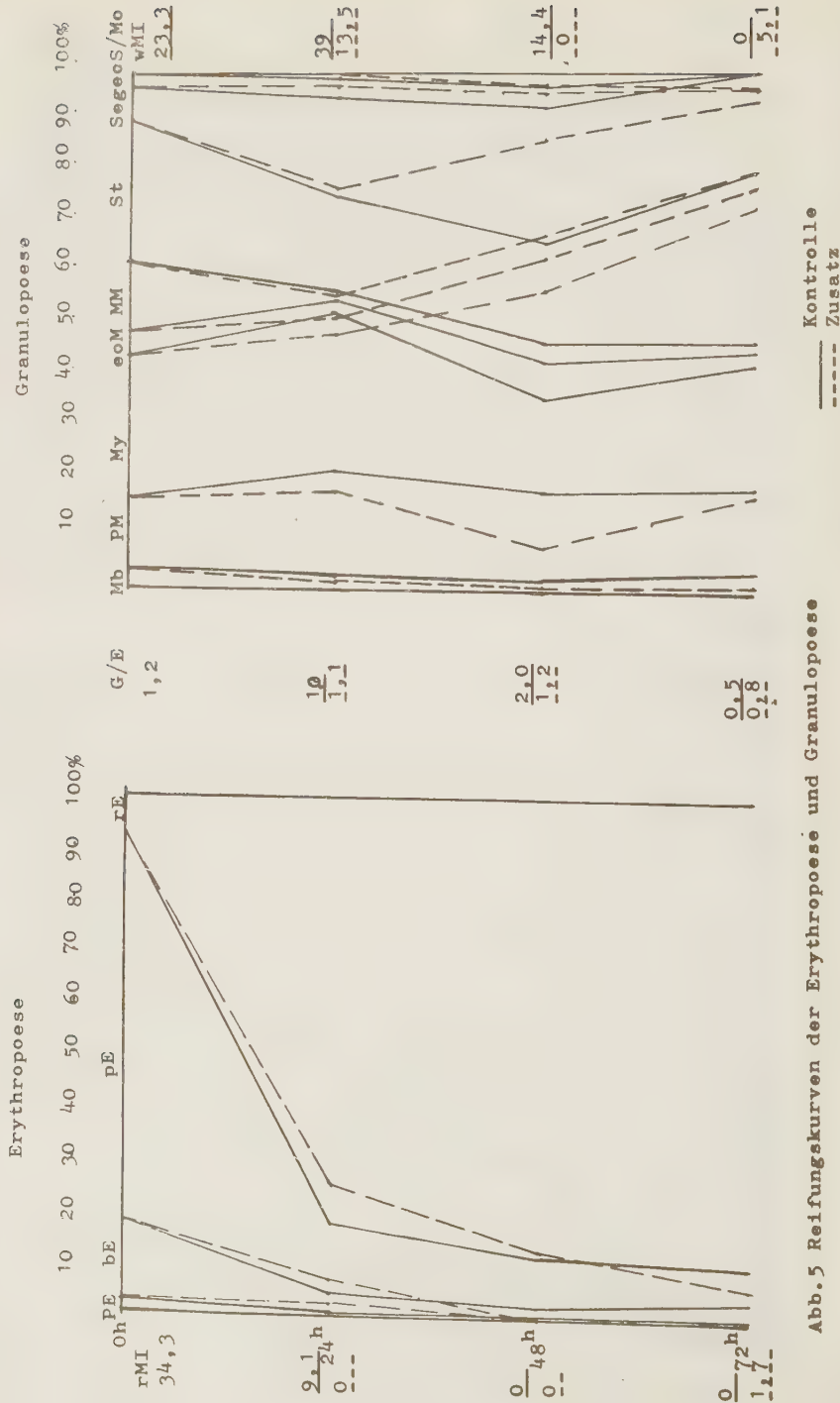


Abb. 5 Reifungskurven der Erythropoese und Granulopoese

satz vermindert, der weiße Mitoseindex nach 24 Std. und nach 48 Std.

Zusammenfassung aller Versuche in Mittelwertkurven der Erythro- und Granulopoese (Abb.6)

Die Mittelwerte der Originalausstriche entsprechen im Wesentlichen den von BOLL⁽⁵⁾ für die Erythropoese angegebenen Normalwerten. Mit fortschreitender Kulturdauer verringert sich der Anteil der teilungsfähigen roten Knochenmarkzellen in den Kontrollkulturen, sodaß nach 72 Std. keine Proerythroblasten mehr auftreten und die basophilen und polychromatischen Erythroblasten ihr Minimum erreichen. Der Anteil der orthochromatischen Erythroblasten verändert sich hingegen nicht. In den Versuchskulturen zeigt sich nach 24 Std. ein deutlich verzögerter Reifungsverlauf, der sich darin ausdrückt, daß der Anteil der unreifen Erythroblasten gegenüber den Kontrollen um durchschnittlich $\frac{1}{3}$ erhöht ist. Nach 48 Std. erscheint der Anteil der Teilungsfähigen nur noch geringfügig erhöht, wohingegen nach 72 Std. der Ausreifungsgrad wieder vergrößert ist.

In der Granulopoese sind unsere Mittelwerte der Originalausstriche insbesondere bei den stabkernigen Granulozyten gegenüber den Normalwerten von BOLL⁽⁶⁾ etwas erhöht, während der Anteil der Metamyelozyten und der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten etwas erniedrigt ist. Die weitere Entwicklung in den Kontrollkulturen entspricht weitgehend den Daten von BOLL⁽⁶⁾. Es zeigt sich, daß nach einem Kulturtag eine ausgeprägte Linksverschiebung stattgefunden hat, die insbesondere auf der relativen Zunahme der Promyelo-

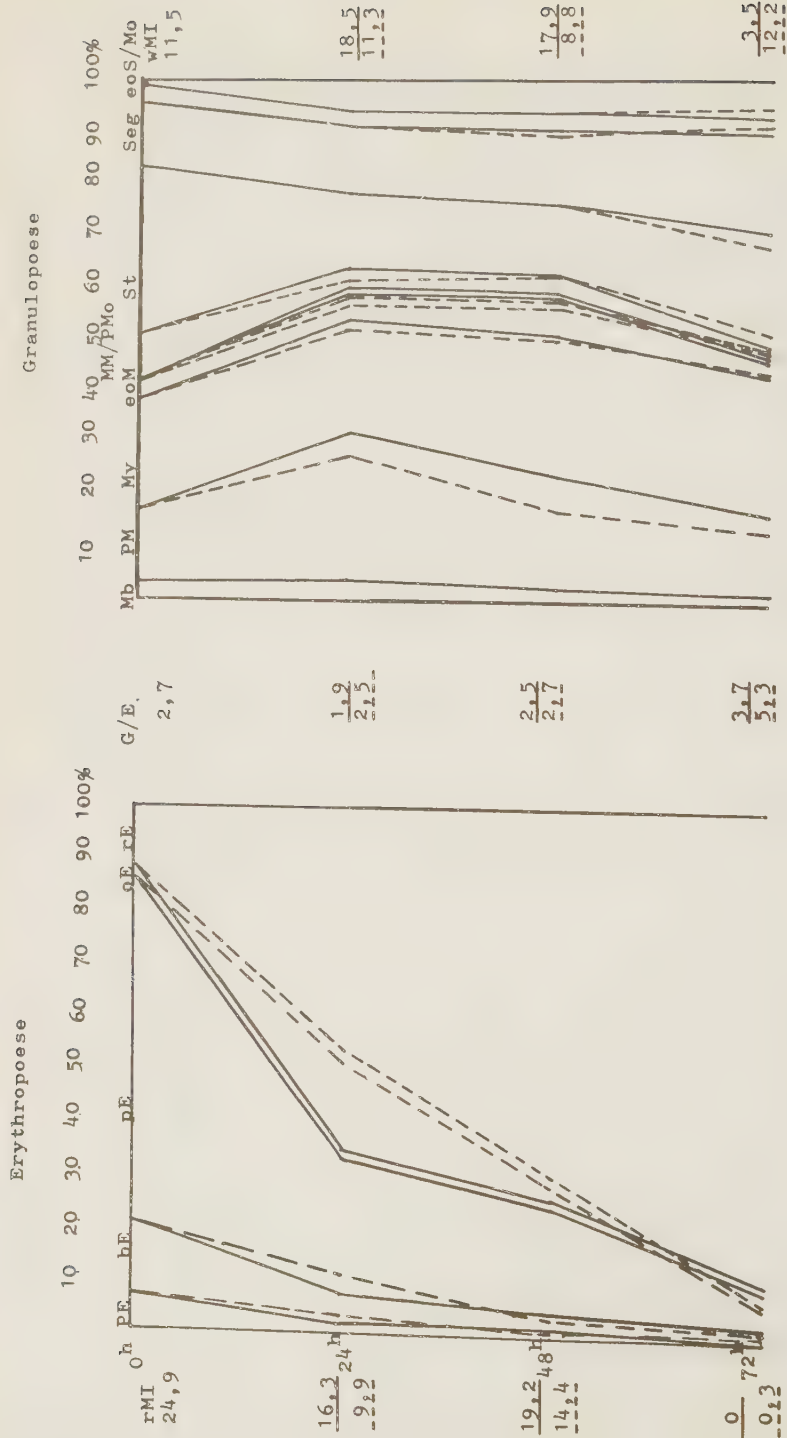


Abb. 6 Reifungskurven der Erythropoese und Granulopoese im arithmetischen Mittel aller Versuche

zyten und der Abnahme der Segmentkernigen beruht. Neben der Verminderung der Granulopoese tritt eine verstärkte Mitosehäufigkeit während der ersten 24 Std. auf, die jedoch bei längerer Kultivierung zurückgeht. Unter Abnahme der Promyelozytenfraktion nähert sich die Differentialverteilung nach 72 Std. wieder der des Originalausstrichs. Es befinden sich jetzt dagegen mehr Segmentkernige in den Kulturen.

Unter dem DHEA-Zusatz findet sich eine geringe Abnahme der Promyelozyten für die gesamte Dauer des Kultivierungszeitraumes, während der Anteil der Segmentkernigen bei Kulturen- de gegenüber den Kontrollen erhöht ist.

Zusammenfassung der Versuche I - IV in Mittelwertkurven der Granulopoese (Abb.6a)

Da das Proliferationsverhalten der Granulopoese im Versuch V von den übrigen Versuchen stark abweicht, wurden die Reifungskurven der Versuche I - IV gesondert zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Jetzt wird an allen drei Kulturtagen - besonders aber in der 72-Std.-Kultur - eine Zunahme der Segmentkernigen und eine Abnahme der Promyelozyten und der Myelozyten, also eine Zunahme der Reifung deutlich.

Mittelwert der G/E-Indices (Tab.1)

Die mittleren G/E-Indices der Kontroll- und Versuchskulturen zeigen während des gesamten Kulturzeitraumes ein gleichsinniges Verhalten. Sie sinken nach 24 Std. ab, steigen am 2.Tag wieder auf den Ausgangswert an und erreichen am 3.Tag ihr Maximum. Dabei ist der Index in den Kulturen mit DHEA-Zusatz zu allen Zeiten erhöht.

Mittelwert der Mitoseindices aller Versuche (Tab.1)

Für die Erythropoese ergibt sich in den Ausgangspräparaten

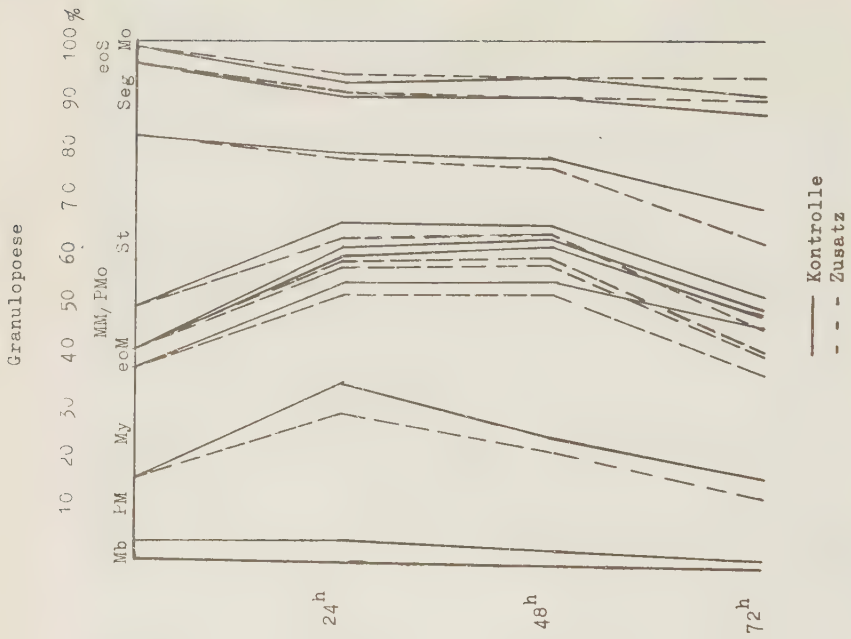


Abb. 6a Reifungskurve der Granulopoese im arithmetischen Mittel der Versuche I-IV

Tab.1 Arithmetische Mittelwerte

G/E- Indices

	0 h	24 K	24 Z	48 K	48 Z	72 K	72 Z
Vers I	4,7	1,7	2,3	2,6	2,0	2,4	5,0
Vers II	1,2	1,6	1,4	2,6	5,3	6,0	11,8
VersIII	3,2	2,9	1,7	2,4	1,1	2,5	4,6
Vers IV	1,6	1,0	1,1	2,0	1,2	0,5	0,8
Vers V	2,6	2,4	5,8	2,9	3,9	6,9	4,1
Mittel	2,7	1,9	2,5	2,5	2,7	3,7	5,3

rM- Indices

Vers I	19,1	7,8	0	19,6	8,1	0	0
Vers II	34,3	9,1	0	0	0	0	1,7
VersIII	8,7	6,6	13,3	20,1	13,5	0	0
Vers IV	28,6	19,8	24,2	35,7	29,4	0	0
Vers V	33,7	38,2	25,3	20,8	21,2	0	0
Mittel	24,9	16,5	9,9	19,2	14,4	0	0,3

wM- Indices

Vers I	3,4	10,8	1,4	9,4	6,9	0	0
Vers II	7,0	13,3	15,5	33,6	14,5	14,6	8,8
VersIII	19,9	8,2	10,6	14,1	15,5	2,2	46,9
Vers IV	23,3	39,0	13,5	14,4	0	0	5,1
Vers V	3,9	21,3	15,7	18,2	7,2	0,9	0
Mittel	11,5	18,5	11,3	17,9	8,8	3,5	12,2

Tab.2 wM- Indices ermittelt aus der Gesamtzahl der Mitosen und der Teilungsfähigen in %

	24 K	24 Z	48 K	48 Z	72 K	72 Z
Mb	2,0	2,0	0,3	0,6	0	1,6
PM	11,1	7,1	10,4	5,1	2,5	6,3
My	3,1	2,6	6,9	3,9	1,5	8,6
eoM	0,3	0	0,9	0,3	0,7	0,4
Mittel	16,5	11,7	18,5	9,9	4,7	17,0

ein mittlerer Mitoseindex von 24,9 ‰. Die im Laufe der Kultur stärker absinkenden Indices weisen auf eine durch den DHEA- Zusatz gebremste Mitoseaktivität hin.

Ein entsprechendes Verhalten findet sich in der Entwicklung des mittleren weißen Mitoseindex. Zwar steigt der Mitoseindex in den Kontrollkulturen nach 24 Std. von 11,5 ‰ auf 18,5 ‰ an und geht erst am 3. Tag deutlich zurück, doch finden sich auch hier in den DHEA- Kulturen nach den ersten zwei Tagen auffällig verminderte Werte. Wenn der Mitoseindex am Ende wieder ansteigt, so muß berücksichtigt werden, daß in den Mittelwert der extrem hohe Wert aus Versuch III eingegangen ist.

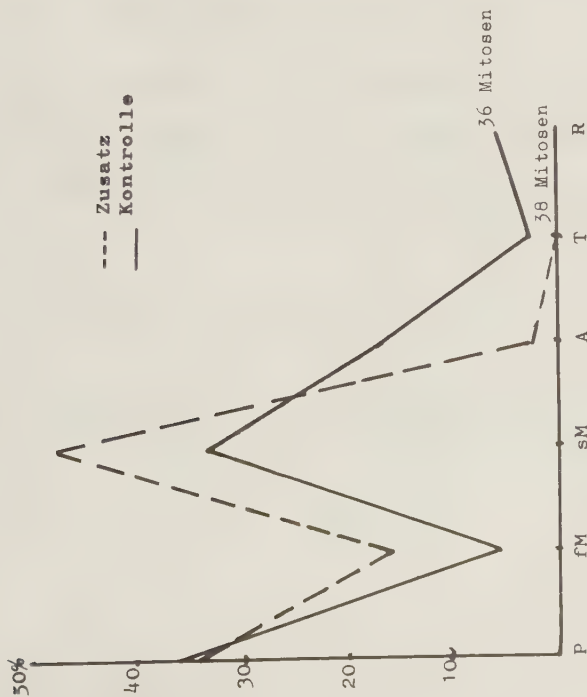
Verteilung der Mitosephasen (Abb. 7)

Die Mitosephasenverteilung ist in Form von caryologischen Kurven dargestellt, wobei sämtliche Mitosen aus den Kontrollversuchen zu einer Kurve zusammengefaßt und den Mitosen aus den Zusatzkulturen gegenübergestellt werden. In der Erythropoese bilden die Prophasen und die späten Metaphasen die Mehrzahl der vorkommenden Mitosestadien. In den Zusatzkulturen findet sich ein analoges Bild; jedoch hat sich der Gipfel bei den späten Metaphasen noch verstärkt, während kaum noch Anaphasen und keine Rekonstruktionsphasen und Telophasen mehr auftreten.

In der Granulopoese zeigen sich keine durch den Zusatz bewirkten Veränderungen in der Häufigkeitsverteilung der Mitosen. In beiden Kulturen liegt das Maximum bei den späten Metaphasen, sodaß die Kurven annähernd identisch verlaufen.

Caryologische Kurven der Erythropoese und Granulopoese

Erythropoese



Granulopoese



Signifikanzberechnung

Zum Nachweis einer unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung im Hinblick auf das Auftreten von Mitosen nach Zusatz von DHEA wurde das χ^2 -Verfahren nach H. PEARSON benutzt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte nach der Formel

$$\chi^2 = \frac{(B - E)^2}{E}$$

B = beobachtete Anzahl der Mitosen

E = erwartete Anzahl der Mitosen

$E = n \cdot a$

n = Gesamtzahl der Teilungsfähigen einer Meßreihe

a = Vereinigte Stichprobe zweier Klassen

Die jedem χ^2 -Wert zugeordnete Wahrscheinlichkeit p ist den graphischen Tafeln von BELITZ zu entnehmen. Für die Beurteilung von p gilt, daß der Unterschied zweier Meßreihen statistisch signifikant ist, wenn

$$p < 0,01$$

In unseren Berechnungen beträgt die Anzahl der Freiheitsgrade 1.

Die Berechnung wurde nur für die Granulopoese durchgeführt, da die Gesamtzahl der Erythroblastenmitosen, die aufgefunden wurden, zu gering war.

Tab.3

Kontrolle	B	E	$(B-E)^2/E$	
	58	51,818	0,757	
	3467	3473,182	0,011	
Zusatz	41	51,641	2,193	24 ^h
	3472	3461,359	0,033	

$$\chi^2 = 2,974$$

$$p > 0,08$$

Kontrolle	B	E	$(B-E)^2/E$	
	62	47,977	4,099	
	3293	3307,023	0,059	
Zusatz	33	47,233	4,289	48 ^h
	3270	3255,767	0,062	

$$\chi^2 = 8,509$$

$$p < 0,01$$

Kontrolle	B	E	$(B-E)^2/E$	
	13	28,772	8,646	
	2676	2660,228	0,094	
Zusatz	43	27,210	9,163	72 ^h
	2500	2515,790	0,099	

$$\chi^2 = 18,002$$

$$p < 0,01$$

Tab.4 Anzahl der Mitosen und der teilungsfähigen Zellen

	24 K	24 Z	48 K	48 Z	72 K	72 Z
Mit	58		62		13	
		41		33		43
TF	3525		3355		2689	
		3513		3203		2543
Mit	7		1		0	
		7		2		4
TF	205		117		54	
		208		114		70
Mit	32		35		7	
		25		17		16
TF	1590		1143		833	
		1361		907		632
Mit	11		23		4	
		9		13		22
TF	1133		1511		1518	
		1361		1700		1384
Mit	1		3		2	
		0		1		1
TF	275		367		144	
		293		295		119

Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus den Reifungskurven aller 5 Versuche ist zu ersehen, daß DHEA in der von uns zugesetzten Konzentration nach 24 Std. einen hemmenden Einfluß auf die Ausreifung von Erythroblasten ausübt.

Die Verringerung des mittleren roten Mitoseindex deutet zudem auf ein durch den Zusatz bewirktes Nachlassen der Zellregeneration hin.

In der Granulopoese tritt unter dem Zusatz eine leichte Beschleunigung der Zellausreifung - besonders unter Zusatz von Glukose - in vier der ausgewerteten Versuche ein. In Versuch V ergibt sich eine Reifungsverzögerung.

Die statistische Überprüfung der unterschiedlichen Häufigkeit der Granuloblastenmitosen weist eine signifikante Herabsetzung der Mitoseaktivität nach 48 Std. und deren Zunahme nach 72 Std. nach (Tab.3). Eine Differenzierung nach Zellklassen (Tab.4) zeigt, daß dann vor allem bei den Promyelozyten und Myelozyten die Regeneration wieder zunimmt (Tab.2).

Der G/E- Index erhöht sich für die gesamte Dauer der Kultivierung und deutet trotz der Reifungshemmung auf eine Verminderung der Erythropoese hin (Tab.1).

Über die Häufigkeitsverteilung der Mitosephasen läßt sich für die Erythropoese auf Grund zu geringer Mitosezahlen keine eindeutige Aussage treffen, während sich in der Granulopoese keine Veränderungen ergeben, da die caryologischen Kurven annähernd synchron verlaufen.

Diskussion

Wie einleitend bereits dargestellt handelt es sich beim DHEA um eine definierte körpereigene Substanz, der auf Grund ihres spezifischen Angriffspunktes von mehreren Verfassern eine regulierende Funktion im Stoffwechsel zugeschrieben wird. In der Annahme, daß es sich hierbei um ein polytop wirksames Prinzip handele, sollte es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein zu untersuchen, ob und in welcher Weise DHEA die Kinetik des menschlichen Knochenmarks direkt beeinflusst. Um eine Einflußnahme von seiten des Organismus auszuschließen, bedienten wir uns des Verfahrens der Knochenmarkskultivierung, dessen Vorteil darin liegt, daß die Vorgänge im Medium nur von Zellreifung, -teilung und -untergang abhängig und somit objektivierbar sind. Hingegen werden Einflüsse auf das Knochenmark durch innersekretorische Beeinflussung und Gegenregulationen naturgemäß ausgeklammert.

Da sich in den Untersuchungen von OERTEL⁽¹⁵⁾ und HOLZMANN⁽¹¹⁾ nur DHEA-Konzentrationen als zuverlässig wirksam erwiesen, die über dem physiologischen Plasmaspiegel von 10^{-7} M/l lagen, setzten wir den Kulturen das Steroid in einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-5}$ M/l zu.

Die Auswertung der von uns erstellten Reifungskurven ergibt eine unterschiedliche DHEA-Wirkung auf Granulopoese und Erythropoese.

In der Mehrzahl der Fälle läßt sich in der Granulopoese eine Reifungsförderung nachweisen, wobei in Betracht zu ziehen wäre, ob es sich hier nicht um eine Reduzierung der teilungsfähigen Vorstufen (siehe Promyelozyten!), folglich um eine nur vorgetäuschte Reifungsförderung handelt.

Im Hinblick auf das menschliche Knochenmark können wir die Aussage von HOLZMANN⁽¹¹⁾, daß DHEA in Kulturen die Mitoseaktivität von stimulierten Lymphozyten reduzieren soll, also bestätigen. Auch läßt die Erkenntnis, daß die Verteilung der Mitosephasen unter DHEA-Einfluß keine Veränderung erfährt, analog zu HOLZMANN⁽¹¹⁾ den Schluß zu, daß die Regenerationshemmung der Knochenmarkszellen im Sinne einer Verhinderung des Mitoseeintritts und nicht im Sinne einer Mitoseverzögerung erfolgt.

In der Erythropoese zeigt sich nach 24 Stunden unter DHEA-Einfluß eine deutliche Reifungshemmung, eine Entwicklung, der auch der gleichzeitige Anstieg des G/E-Indexes entspricht. Wie bei den Granuloblasten kommt es zu einer Herabsetzung der Zellregeneration; allerdings ist hier das Material für eine statistische Überprüfung nicht ausreichend. Für eine von TAKAKU⁽¹⁷⁾ beschriebene Stimulierung der Erythropoese ergibt sich in unseren Versuchen kein Anhalt.

Unter Berücksichtigung aller Parameter können wir also dem Hormon DHEA in der von uns angewandten Konzentration einen proliferationshemmenden Einfluß auf menschliche Knochenmarkszellen in Kulturen zuschreiben.

Zusammenfassung

An menschlichen Knochenmarkszellen, die durch Punktion von 5 verschiedenen Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen gewonnen und über 72 Stunden in Kulturen gezüchtet wurden, wurde der direkte Einfluß von freiem Dehydroepiandrosteron in einer Endkonzentration von $1,5 \cdot 10^{-5}$ M/l auf die Proliferationskinetik getestet.

Die Ergebnisse wurden in Form von Reifungs- und Mitosephasenverteilungskurven, Mitose- und G/E-Indices dargestellt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen.

Es wurde nachgewiesen, daß Dehydroepiandrosteron die Regeneration bremst, die Reifung der Erythropoese verzögert und in der Granulopoese eine mäßige Rechtsverschiebung bewirkt.

Literaturverzeichnis

- 1) Beaulieu, E.-E., C. Corpéchet, F. Dray, R. Emiliozzi,
M.-C. Lebeau, P. Mauvais-Jarvis, P. Robel: An Adrenal-Secreted
"Androgen": Dehydroisoandrosteron Sulfate. Its Metabolism
and a Tentative Generalization on the Metabolism of other
Steroid Conjugates in Man
Rec. Progr. Horm. Res. 21 (1965) 411
- 2) Belitz, H.-J.: Die Anwendung statistischer Methoden
in der Biologie
Der Mathematikunterricht 3 (1960) 83
- 3) Benes, P. and Oertel, G.-W.: Inhibition of Glucose-6
-Phosphate Dehydrogenase by Steroids III
Effects of Dehydroepiandrosterone, Its Conjugates and
Derivates upon the Activity of Human Placental Glucose
-6-Phosphate Dehydrogenase
J. Ster. Bioch. 2 (1971) 289
- 4) Boll, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und
pathologischen Bedingungen
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966
- 5) Boll, I. und Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen
zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen
Erythropoese in vitro
Blut XVII (1968) 193

- 6) Boll, I. und Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese in vitro
Blut XIX (1969) 257
- 7) Hilgertová, J., Straková, M. et al.: Seasonal Variations of Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Relation to Temperature and Dehydroepiandrosterone Excretion
Clin.Chim.Acta 36 (1972) 511
- 8) Holzmann, H. und Hoede, N.: Das Psoriasis-Problem in heutiger Sicht
Hippokrates 43 (1972) 73
- 9) Holzmann, H., Krapp, R. et al.: Zur Therapie der Psoriasis mit Dehydroepiandrosteron-Sulfat
Ärztl.Forsch. 25 (1971) 345
- 10) Holzmann, H., Morsches, B. et al.: Zur Therapie der Psoriasis mit Dehydroepiandrosteron-Oenanthat
Zschr.Haut-Geschl-Krh(Berlin) 47 (1972) 3
- 11) Holzmann, H., Fränz, J. et al.: Einfluß des Dehydroepiandrosterons auf den Mitosezyclus
Arzneim.Forsch.(Drug Res.) 23 (1973) 271
- 12) Holzmann, H., Krapp, R. et al.: Kann die Schuppenflechte als DHEA-Mangelsyndrom aufgefaßt werden?
Zschr.Haut-Geschl-Krh(Berlin) 46 (1971) 785

- 13) Holzmann, H., Morsches, B. et al.: Untersuchungen zum DHEA-Gehalt im Plasma von Psoriatikern
Zschr. Haut-Geschl. Krh (Berlin) 45 (1970) 579
- 14) Oertel, G.W., Menzel, P. et al.: Effects of Dehydroepiandrosterone and its Conjugates upon the Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
Clin. Chim. Acta 27 (1970) 197
- 15) Oertel, G.W., und Rebelein, I.: Effects of Dehydroepiandrosterone and its Conjugates upon the Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Human Erythrocytes
Bioch. Biophys. Acta 184 (1969) 459
- 16) Schindler, A.E., Walk, T. et al.: Betrachtungen zum Stoffwechsel von Dehydroepiandrosteron während der Schwangerschaft
Med. Welt (N.F.) 23 (1972) 1947
- 17) Takaku, F. in Aschkenasy, A.: Erythropoietic Effect of Testosterone Administered to Male Rats by the Percutaneous or Subcutaneous Route. -Comparison between the Renotrophic, Androgenic and Erythropoietic Effect of the Hormone
In "Erythropoiesis" ed. by Matoth, Y. S.85
Academic Press New York/London 1970
- 18) Voss, H.E. und Oertel, G.: Androgene I
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1973

Ich danke Frau Prof.Dr.I.Boll für
die freundliche Überlassung des
Themas und ihre stets bereitwillige
Unterstützung.

Herrn Prof.Dr.H.-J.Belitz danke ich
für die Überwachung der Signifikanz-
berechnungen.

Die Arbeit wurde unterstützt durch
Mittel der DFG.

Lebenslauf

Ich wurde am 9. November 1946 als Sohn des Kaufmanns Wilhelm Lange und seiner Ehefrau Viktoria, geb. Panck, in Neumünster geboren. Hier besuchte ich ab Ostern 1953 die Gartenschule und wechselte 4 Jahre später auf ein neusprachlich-naturwissenschaftliches Gymnasium, die Holstenschule, an dem ich Ostern 1966 auf dem sprachlichen Zweig kurz nach dem Tode meines Vaters das Abitur ablegte. Nach zweijährigem Wehrdienst wurde ich im SS 1968 an der Freien Universität Berlin immatrikuliert und studierte das Fach Zahnmedizin. Hier legte ich im WS 1968/69 das Vorphysikum ab und bestand im SS 1970 das Physikum. Nach weiterem klinischen Studium erhielt ich im SS 1973 die zahnärztliche Approbation. Zur Zeit bin ich in der Praxis eines Berliner Zahnarztes als Assistent tätig.

